

Metode pemeriksaan penyakit pada ikan bernilai tinggi tanpa mematikan (*non-lethal*)



© BSN 2014

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Gd. Manggala Wanabakti
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.
Telp. +6221-5747043
Fax. +6221-5747045
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Istilah dan definisi	1
3 Prinsip.....	3
4 Peralatan	3
5 Bahan	3
6 Prosedur kerja	4
Lampiran A (informatif) Bahan keperluan diagnosis.....	8
Lampiran B (informatif) Teknik fiksasi parasit.....	9
Lampiran C (informatif) Teknik Pewarnaan Parasit Menggunakan Semichon's Aceto-carmine	10
Lampiran D (informatif) Gambar lokasi pengambilan darah, pembuatan preparat apus, pencucian saluran pencernaan.....	11
Bibliografi	12

Prakata

Dalam rangka keberlanjutan usaha budidaya, meningkatkan produktivitas, mempertahankan nilai ekonomis dan jaminan mutu komoditas perikanan budidaya serta memberikan hasil uji yang akurat bagi setiap pengujian di laboratorium acuan dan uji maka perlu disusun suatu Standar Nasional Indonesia (SNI) tentang Metode pemeriksaan penyakit pada ikan bernilai tinggi tanpa mematikan (*non-lethal*).

Standar ini dirumuskan oleh Panitia Teknis (PT) 65-07 Perikanan Budidaya dan dibahas dalam rapat konsensus pada tanggal 27 Agustus 2013 di Bogor yang dihadiri oleh anggota panitia teknis, unsur pemerintah, lembaga penelitian dan instansi terkait lainnya dengan memperhatikan:

1. Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. PER. 19/Men/2010 tentang Pengendalian Sistem Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Pangan.
2. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. Kep. 01/Men/2002 tentang Sistem Manajemen Mutu Terpadu Hasil Perikanan.
3. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No. Kep. 06/Men/2002 tentang Persyaratan dan Tata Cara Pemeriksaan Mutu Hasil Perikanan yang Masuk ke wilayah Republik Indonesia.
4. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. Kep. 21/Men/2004 tentang Sistem Pengawasan dan Pengendalian Mutu Hasil Perikanan untuk Pasar Uni Eropa.
5. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. Kep. 03/Men/2010 tentang Daftar Hama Penyakit Ikan Karantina.
6. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No. 28 tahun 2004 tentang Keamanan, Mutu dan Gizi Pangan.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 8 November 2013 sampai dengan 6 Januari 2014 dengan hasil akhir RASNI.

Metode pemeriksaan penyakit pada ikan bernilai tinggi tanpa mematikan (*non-lethal*)

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan metode pemeriksaan penyakit pada ikan bernilai tinggi tanpa mematikan (*non-lethal*).

2 Istilah dan definisi

Untuk tujuan dan penggunaan dalam dokumen ini, istilah dan definisi berikut digunakan.

2.1

anestesi

pengurangan atau penghilangan sensasi untuk sementara, sehingga operasi atau prosedur lain yang menyakitkan dapat dilakukan

2.2

antibodi

protein molekul besar yang diproduksi oleh hewan vertebrata sebagai respons imun spesifik terhadap antigen yang masuk ke dalam tubuh

2.3

antigen

zat asing (protein atau toksin) yang dapat menstimulasi pembentukan antibodi

2.4

antikoagulan

zat yang dapat mencegah penggumpalan darah

2.5

bakteri

mikroorganisme yang tidak memiliki membran inti sel yang dapat hidup secara independen (bebas) atau sebagai parasit (tergantung pada organisme lain untuk hidup)

2.6

biopsi

pengambilan jaringan pada saat hewan masih hidup

2.7

cendawan

kelompok organisme bersel satu atau lebih bereproduksi dengan spora dan memakai bahan organik sebagai sumber makanan misalnya ragi, jamur dan kapang

2.8

debris

serpihan-serpihan sel pada daerah luka

2.9

diagnosis

identifikasi sifat-sifat penyakit atau kondisi atau membedakan satu penyakit atau kondisi dari yang lainnya. Penilaian dapat dilakukan melalui pemeriksaan fisik, tes laboratorium, atau sejenisnya, dan dapat dibantu oleh program komputer yang dirancang untuk memperbaiki proses pengambilan keputusan

2.10

dropsi (*dropsy*)

penumpukan cairan dalam rongga tubuh yang merupakan gejala akibat infeksi penyakit

2.11

fiksasi

suatu proses untuk mempertahankan struktur jaringan pada kondisi stabil dengan bahan fiksatif

2.12

lethal

bersifat mematikan

2.13

lesi

keadaan abnormalitas jaringan karena proses infeksi penyakit, trauma fisik dan kimiawi

2.14

maserasi

proses disintegrasi jaringan dengan perlakuan fisik atau kimiawi

2.15

mounting

proses mempersiapkan spesimen agar menempel pada gelas objek untuk keperluan pemeriksaan mikroskopis

2.16

mukus

lapisan lendir yang menutupi permukaan tubuh ikan

2.17

parasit

organisme yang hidup dan memperoleh makanan dari makhluk hidup lain yang dijadikan tempat hidupnya

2.18

polymerase chain reaction

reaksi berantai polimerase, merupakan untai DNA panjang tertentu secara *in vitro* menggunakan enzim polimerase

2.19

preservasi

proses pengawetan jaringan dengan menggunakan bahan kimia (*preservatif*)

2.20

serum

cairan bening yang dipisahkan dari sel-sel darah dan tidak memiliki faktor pembekuan karena diperoleh dari darah yang telah dibiarkan menggumpal

2.21 virus

mikroorganisme bersifat parasit yang berada dalam sel tubuh dan hanya mampu bereproduksi pada material hidup (parasit obligat intraseluler)

3 Prinsip

Metode ini dilakukan untuk keperluan pemeriksaan laboratorium lebih lanjut melalui pengambilan contoh uji berupa jaringan dan cairan tubuh pada ikan yang dianestesi terlebih dahulu.

4 Peralatan

- a) aerator baterai;
- b) bak parafin;
- c) baskom;
- d) botol contoh uji;
- e) cawan petri;
- f) *compound microscope* dan *stereomicroscope*;
- g) *dissecting set*;
- h) jarum Ose;
- i) kamera digital minimal 5 MP;
- j) lampu Bunsen;
- k) seser (*scoop net*);
- l) *sprayer*;
- m) wadah limbah.

5 Bahan

- a) antikoagulan;
- b) bahan anestesi;
- c) *cotton bud*;
- d) disinfektan;
- e) etanol;
- f) formalin;
- g) gelas objek;
- h) gelas penutup;
- i) handuk;
- j) iodine atau KMnO_4 ;
- k) kacamata laboratorium;
- l) kateter;
- m) larutan fiksatif lainnya (*Davidson's, Bouin*);
- n) larutan Giemsa;
- o) masker;
- p) media agar umum;
- q) media cendawan;
- r) metanol;
- s) *pellet pestle*;
- t) *phosphate buffer saline* (PBS);
- u) sarung tangan;
- v) *syringe* 1 ml - 3 ml ukuran jarum 18G - 26G;
- w) tabung mikro 1,5 ml.

6 Prosedur kerja

Pemeriksaan bakteri, virus dan parasit yang berada pada darah, mukus, insang, feses, cairan perut dan lesi tubuh bagian luar dilakukan dengan cara sebagai berikut:

6.1 Pengambilan dan preparasi darah

- bius ikan terlebih dahulu untuk menghindari stres maupun cedera;
- letakkan ikan pada handuk basah dan posisikan sedemikian rupa sehingga memudahkan pengambilan darah;
- ambil darah dari pembuluh darah bagian pangkal ekor (*vena caudalis*) dengan atau tanpa menggunakan antikoagulan (disesuaikan dengan tujuan pemeriksaan). Ikan berukuran kurang dari 15 g darah hanya dapat diambil kurang dari 0,2 ml;
- awetkan darah dalam larutan fiksatif untuk pemeriksaan qPCR dan PCR, darah kemudian disimpan pada suhu maksimal -20 °C;
- biarkan darah menggumpal pada 4 °C selama 1 jam dan ambil serumnya (bagian atas, berwarna bening) untuk pemeriksaan serologis;
- sentrifugasi darah dengan kecepatan 3 000 r/min selama 10 menit. Serum dapat bertahan 1 minggu pada 4 °C dan 1 tahun pada -20 °C.

6.1.1 Pemeriksaan parasit

- teteskan darah pada permukaan gelas objek;
- buat preparat apus darah;
- fiksasi dan warnai untuk karakterisasi dan koleksi parasit;
- amati langsung dengan mikroskop.

6.1.2 Pemeriksaan bakteri

- ambil darah dengan *syringe* steril;
- inokulasikan pada permukaan media agar umum dengan menggunakan jarum Ose;
- inkubasikan pada 28 °C – 32 °C selama 12 jam - 24 jam.
- lakukan identifikasi lebih lanjut.

6.1.3 Pemeriksaan cendawan

- ambil darah dengan *syringe* steril;
- inokulasikan pada permukaan media cendawan;
- inkubasikan pada 28 °C – 32 °C selama 12 jam - 72 jam;
- lakukan identifikasi lebih lanjut.

6.1.4 Pemeriksaan virus

- ambil darah dengan *syringe* steril.
- awetkan dengan larutan preservatif yang sesuai.
- lakukan pemeriksaan dengan metode PCR.

6.1.5 Pemeriksaan komponen darah

Apabila dari hasil pemeriksaan darah secara parasitologis, bakteriologis dan virologis tidak ditemukan adanya patogen, maka dilanjutkan dengan pemeriksaan komponen darah untuk mengetahui status kesehatan ikan.

6.2 Pemeriksaan mucus

6.2.1 Pemeriksaan parasit

- a) ambil mukus dengan *spatula*;
- b) oleskan pada permukaan gelas objek, amati langsung dengan mikroskop;
- c) fiksasi dengan bahan fiksatif yang sesuai (Lampiran B) dan warnai untuk karakterisasi dan koleksi parasit. Teteskan bahan *mounting* pada gelas objek lalu tutup dengan gelas penutup.

6.2.2 Pemeriksaan bakteri

- a) ambil mukus dengan jarum Ose steril;
- b) oleskan pada permukaan media agar umum;
- c) inkubasikan pada 28 °C – 32 °C selama 12 jam - 24 jam;
- d) lakukan identifikasi lebih lanjut.

6.2.3 Pemeriksaan cendawan

- a) ambil mukus dengan jarum Ose steril;
- b) tanam pada permukaan media agar cendawan;
- c) inkubasikan pada 28 °C – 32 °C selama 12 jam - 24 jam;
- d) lakukan identifikasi lebih lanjut.

6.2.4 Pemeriksaan virus

- a) ambil mukus dengan *cotton bud* atau spatula steril;
- b) awetkan dengan larutan preservatif yang sesuai;
- c) lakukan pemeriksaan dengan metode PCR.

6.3 Pemeriksaan feses/pencucian saluran pencernaan

- a) masukkan kateter baru dan steril yang dihubungkan dengan *syringe* yang berisi PBS ke dalam mulut;
- b) bilas lambung dan keluarkan isinya melalui mulut;
- c) masukkan kateter melalui anus lalu hisap dengan *syringe*.

6.3.1 Pemeriksaan parasit

- a) teteskan satu tetes PBS pada gelas objek;
- b) teteskan isi kateter pada gelas objek;
- c) tutup dengan gelas penutup;
- d) amati dengan mikroskop.

6.3.2 Pemeriksaan bakteri

- a) tuangkan isi kateter dalam PBS steril dan homogenkan;
- b) oleskan pada permukaan media agar umum;
- c) inkubasikan pada 28 °C – 32 °C selama 12 jam - 24 jam;
- d) lakukan identifikasi lebih lanjut.

6.3.3 Pemeriksaan virus

- a) tuangkan isi kateter ke dalam larutan preservatif yang sesuai;
- b) uji dengan metode PCR.

6.4 Pemeriksaan cairan dalam rongga perut (intraperitoneal)

- a) sterilkan permukaan abdominal ikan yang menunjukkan gejala pembesaran (*abdominal dropsy*) dengan larutan iodine;
- b) ambil cairan rongga perut dengan menggunakan *syringe* steril dan simpan dalam tabung mikro steril.

6.4.1 Pemeriksaan bakteri

- a) ambil cairan rongga perut dengan jarum Ose;
- b) inokulasikan pada permukaan media agar umum dengan menggunakan jarum Ose;
- c) inkubasikan pada 28 °C – 32 °C selama 12 jam - 24 jam;
- d) lakukan identifikasi lebih lanjut.

6.4.2 Pemeriksaan virus

- a) ambil cairan rongga perut dengan pipet steril;
- b) awetkan dengan larutan preservatif yang sesuai;
- c) lakukan pemeriksaan dengan metode PCR.

6.5 Biopsi insang ikan

- a) angkat operkulum menggunakan pinset anatomi (berujung tumpul) kemudian secara aseptis gunting 4 filamen - 5 filamen insang dan luka diolesi dengan iodine;
- b) segera kembalikan ikan ke dalam air;
- c) simpan filamen di dalam wadah steril untuk pemeriksaan selanjutnya.

6.5.1 Pemeriksaan parasit

- a) ambil filamen insang dengan pinset;
- b) maserasi filamen insang dengan batang gelas;
- c) letakkan hasil maserasi pada permukaan gelas objek yang telah diberi PBS steril atau air mineral;
- d) amati langsung dengan mikroskop;
- e) fiksasi dengan bahan fiksatif yang sesuai dan warnai untuk karakterisasi dan koleksi parasit.

6.5.2 Pemeriksaan bakteri

- a) ambil filamen insang dengan pinset steril;
- b) masukkan ke dalam tabung mikro, tambahkan PBS dan homogenkan dengan *pellet pestle*;
- c) inokulasikan pada permukaan media agar umum dan media agar selektif (sesuai diagnosis awal) menggunakan jarum Ose;
- d) inkubasikan pada 28 °C – 32 °C selama 12 jam - 24 jam;
- e) lakukan identifikasi lebih lanjut.

6.5.3 Pemeriksaan cendawan

- a) ambil filamen insang dengan pinset steril;
- b) masukkan ke dalam tabung mikro, tambahkan PBS dengan rasio 9:1 dan homogenkan dengan *pellet pestle*;
- c) inokulasikan pada permukaan media cendawan dengan menggunakan jarum Ose;
- d) inkubasikan pada 28 °C – 32 °C selama 12 jam - 72 jam;
- e) lakukan identifikasi lebih lanjut.

6.5.4 Pemeriksaan virus

- a) ambil filamen insang dengan pinset steril;
- b) awetkan dengan larutan preservatif yang sesuai;
- c) lakukan pemeriksaan dengan metode PCR.

6.6 Lesi eksternal

6.6.1 Pemeriksaan parasit

- a) ambil debris luka dengan menggunakan *spatula*;
- b) letakkan contoh uji pada permukaan gelas objek;
- c) tetesi dengan larutan PBS;
- d) amati langsung dengan mikroskop;
- e) fiksasi dengan bahan fiksatif yang sesuai dan warnai untuk karakterisasi dan koleksi parasit.

6.6.2 Pemeriksaan bakteri

- a) usap seluruh permukaan luka dengan etanol 70%;
- b) buat sayatan tipis di daerah luka dengan pisau bedah steril;
- c) isolasi bakteri dari daerah sayatan dengan menggunakan Ose steril;
- d) inokulasikan pada permukaan media agar umum;
- f) inkubasi pada 28 °C – 32 °C selama 12 jam - 24 jam;
- e) lakukan identifikasi lebih lanjut.

6.6.3 Pemeriksaan cendawan

- a) ambil hifa jamur yang tumbuh di sekitar lesi untuk cendawan eksternal atau ambil debris lesi dan langsung tumbuhkan pada media cendawan umum;
- b) untuk cendawan internal seluruh permukaan luka diusap dengan iodine 70%;
- c) buat sayatan tipis di daerah luka dengan pisau bedah steril;
- d) ambil jaringan di bawah luka dengan pisau bedah;
- e) Inokulasikan jaringan tersebut pada permukaan media cendawan umum;
- g) Inkubasi pada 28 °C – 32 °C selama 12 jam - 72 jam;
- f) lakukan identifikasi lebih lanjut

6.6.4 Pemeriksaan virus

- a) ambil debris lesi dengan *cotton bud*;
- b) awetkan dengan larutan preservatif yang sesuai;
- c) lakukan pemeriksaan dengan metode PCR.

Lampiran A
(informatif)
Bahan keperluan diagnosis

Tabel A.1 - Bahan yang dapat dijadikan contoh uji untuk keperluan diagnosis penyakit ikan

No	Jenis Contoh	Target Patogen	Metode
1	Darah dan serum darah	Bakteri Virus Parasit Cendawan	PCR Kultur Agar Mikroskopik
2	Mukus	Bakteri Virus Parasit Cendawan	PCR Kultur Agar Mikroskopik
3	Feses/isi perut	Bakteri Virus Parasit	PCR Kultur Agar Mikroskopik
4	Cairan rongga perut	Bakteri Virus	PCR Kultur Agar
5	Insang, sirip dan operkulum	Bakteri Virus Parasit Cendawan	PCR Kultur Agar Mikroskopik
6	Lesi eksternal	Bakteri Virus Parasit Cendawan	PCR Kultur Agar Mikroskopik

Lampiran B
(informatif)
Teknik fiksasi parasit

B.1 Fiksasi kelompok *myxosporea* dalam 10% formalin.

B.2 Untuk tropozoit, tempatkan sebanyak mungkin pada gelas objek. Tambahkan satu tetes Polyvinyl alkohol-Asam Asetat Formalin alkohol (PVA-AFA), kemudian biarkan kering. Protozoa dapat juga langsung dimasukkan ke dalam vial berisi 10% formalin.

B.3 Untuk monogenea/trematoda, pindahkan ke petri dish, buang sisa air tawar/air laut, tambahkan 10% formalin/AFA yang telah dipanaskan pada suhu 85°C - 95°C. Untuk jenis monogenea dapat juga dimasukkan ke dalam 10% larutan formalin.

B.4 Untuk cestoda, fiksasi dengan formalin yang dipanaskan, kemudian simpan dalam larutan 10% formalin.

B.5 Untuk Nematoda, fiksasi dengan gliserin-alkohol (1 bagian gliserin : 3 bagian 95% ethanol) bersuhu 85°C, kemudian simpan dalam gliserin alkohol dingin.

B.6 Untuk *Acanthocephala*, pindahkan ke aquades dan dinginkan selama semalam kemudian masukkan ke dalam 10% formalin/AFA.

B.7 Untuk lintah, fiksasi dalam larutan 10% formalin.

B.8 Untuk Copepod, masukkan ke dalam gliserin alkohol atau 70% etanol. Jika sulit dipisahkan dari jaringan, masukkan copepod bersama sedikit jaringan ke dalam larutan 10% formalin atau 70% etanol.

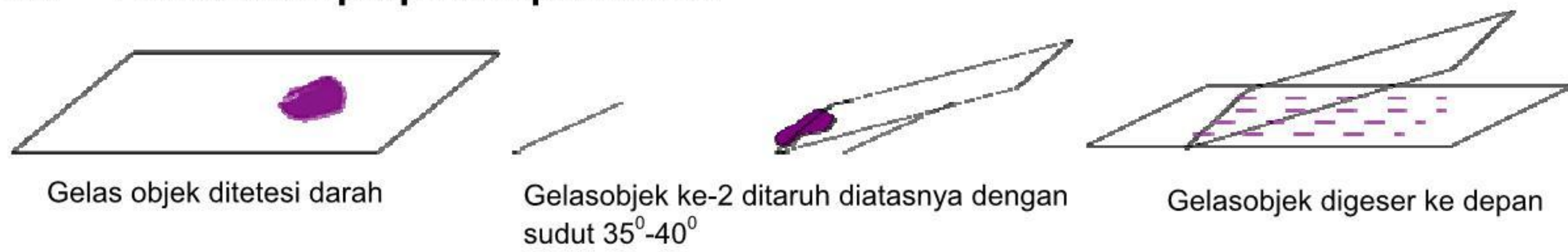
Lampiran C
(informatif)
Teknik Pewarnaan Parasit Menggunakan Semichon's Aceto-carmin

- C.1** Hilangkan sisa larutan fiksatif formalin menggunakan akuades dan fiksatif AFA menggunakan 70% alkohol.
- C.2** Warnai dengan Semichon's Aceto-carmin selama semalam, buang larutan pewarna, kemudian bilas sisanya menggunakan 70% etanol (dua kali pencucian masing-masing 5 menit -10 menit).
- C.3** Lakukan proses destaining menggunakan 70% asam alkohol sampai warna otot dan parenkhim berwarna pink terang sedangkan organ dalam berwarna merah. Amati proses ini menggunakan *dissecting* mikroskop.
- C.4** Hentikan proses *destaining* dengan membilas preparat dengan alkohol (dua kali, masing-masing 5 menit -10 menit).
- C.5** Lakukan proses dehidrasi menggunakan 95% etanol selama 15 menit.
- C.6** Lakukan *counterstain* menggunakan larutan campuran *Fast green* – 95% etanol. Amati selama pewarnaan menggunakan *dissecting* mikroskop (warna hijau kebiruan).
- C.7** Lakukan proses dehidrasi dengan larutan ethanol absolut (dua kali, masing-masing (10 menit -15 menit)
- C.8** Bersihkan dalam methyl salisilat atau *xylene* selama 10 menit.
- C.9** Pindahkan specimen ke gelas objek bersih sesuai dengan posisi yang diinginkan.
- C.10** Tambahkan media mounting, biarkan kering. Bersihkan sisa media mounting menggunakan pisau.

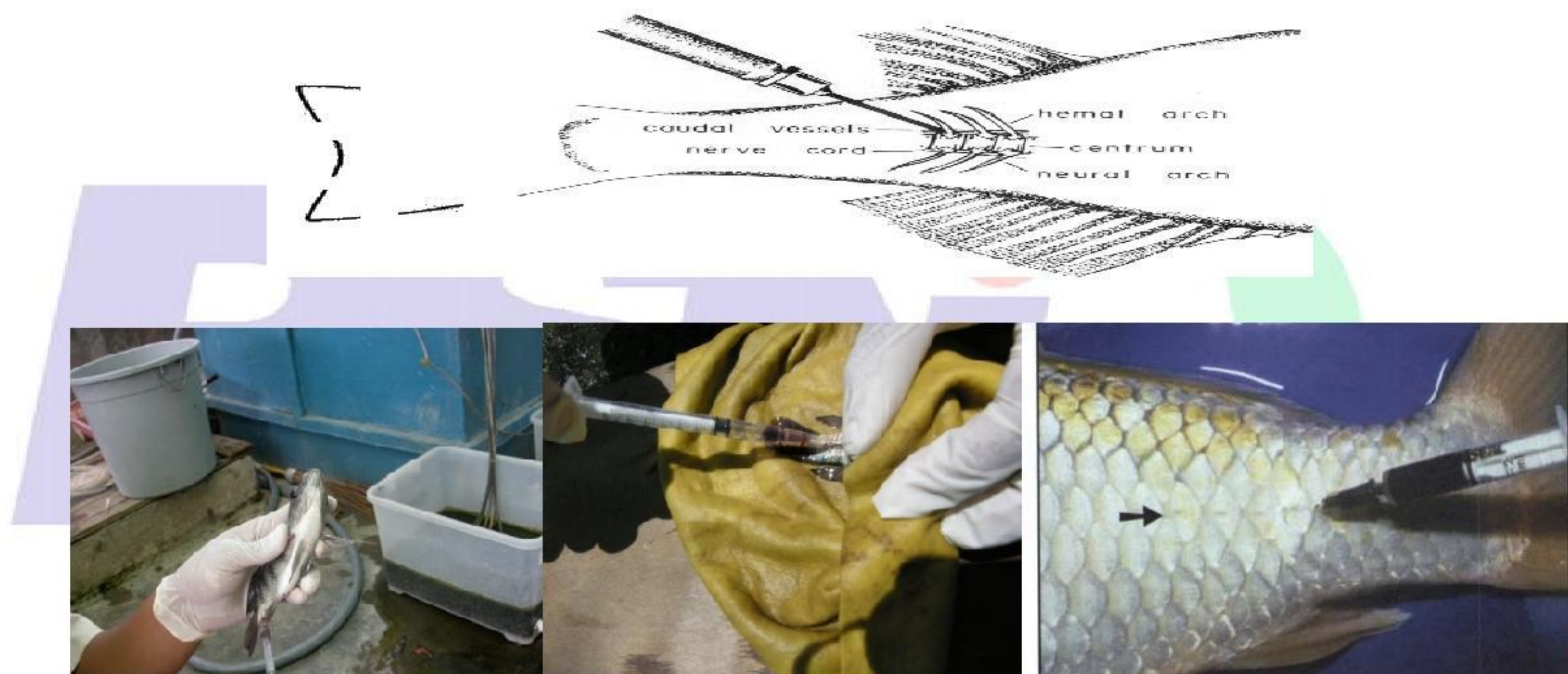
Lampiran D (informatif)

Gambar lokasi pengambilan darah, pembuatan preparat apus, pencucian saluran pencernaan

D.1 Pembuatan preparat apus darah



D.2 Lokasi pengambilan darah



D.3 Pencucian saluran pencernaan



Bibliografi

Barbash Patricia. 2004. *Non-Lethal Methodology For Detection Of Fish Pathogen*. Pennsylvania: United State Fish And Wildlife Service.

British Small Animal Veterinary Association. 2001. *BSAVA Manual Of Ornamental Fish*. Gloucestershire: British Small Animal Veterinary Association

Ostrander GK. 2000. *The Handbook Of Experimental Animal: The Laboratory Fish*. Massachusett: Academic Press.

Smith SA. 2002. *Nonlethal clinical techniques used in the diagnosis of diseases of fish*. JAVMA. 220:1203-1206

